

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/018667 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, C07K 14/82, 5/06,  
A61K 39/00, A61P 35/00, G01N 33/574

台4-6-1 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析セン  
ターゲノムシークエンス解析分野内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010459

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI,Yusuke et al.); 〒  
105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒ  
ルビル 3階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003年8月19日 (19.08.2003)

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(30) 優先権データ:  
特願2002-245831 2002年8月26日 (26.08.2002) JP

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイド」を参照。

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について):麒麟  
麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)  
[JP/JP]; 〒104-8288 東京都 中央区 新川二丁目 10番  
1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 西村 泰治  
(NISHIMURA,Yasuharu) [JP/JP]; 〒860-8556 熊本  
県 熊本市 本荘 1-1-1 熊本大学大学院医学薬学研  
究部 免疫識別学分野内 Kumamoto (JP). 中面 哲也  
(NAKATSURA,Tetsuya) [JP/JP]; 〒860-8556 熊本県 熊  
本市 本荘 1-1-1 熊本大学大学院医学薬学研究部免  
疫識別学分野内 Kumamoto (JP). 中村 祐輔 (NAKA  
MURA,Yusuke) [JP/JP]; 〒108-8639 東京都 港区 白金



A1

(54) Title: PEPTIDES AND DRUGS CONTAINING THE SAME

(54) 発明の名称: ペプチド及びこれを含む医薬

(57) Abstract: It is intended to provide a novel and useful immunotherapy for HCC and a clinically useful diagnostic for hepatocellular carcinoma. More specifically speaking, a peptide comprising an amino acid sequence represented by any of SEQ ID NOS:5 to 16 from which an HLA-A24-restricted and HCC-reactive CTL can be prepared. It is also intended to provide a diagnostic for hepatocellular carcinoma which contains an antibody against GPC3.

WO 2004/018667

(57) 要約: 本発明は、HCCの新規かつ有用な免疫治療法を提供すると共に、臨床的に有用な肝細胞癌の診断剤を提  
供する。具体的には、HLA-A24拘束性であり、かつHCC反応性のCTLを調製することができる、GPC3由  
來の配列番号5～16のいずれかに示すアミノ酸配列からなるペプチドを提供する。また、GPC3に対する抗体  
を含む、肝細胞癌の診断剤を提供する。

## 明細書

## ペプチド及びこれを含む医薬

## 技術分野

本発明は、癌ワクチンとして有効な新規ペプチド、当該ペプチドを含む腫瘍の治療及び予防のための医薬、並びに肝細胞癌の新規な診断剤に関する。

## 背景技術

原発性肝細胞癌（HCC）は、世界中で最も一般的な悪性疾患の一つである。B型及びC型肝炎の世界的な流行により、アジアや欧洲諸国におけるHCCの発生率は急激に上昇しており（Schafer, D. F. 及び Sorrell, M. F., Lancet 353, 1253-1257 (1999)）、HCC感染から発病までの長い潜在期間を考慮すると今後50年にわたってこの傾向が続くものと予想される。病状の進んだHCCの予後は芳しくなく、新たな治療戦略が緊急に必要とされている。

一方、近年の分子生物学及び腫瘍免疫学の進展により、腫瘍応答性細胞傷害性Tリンパ球（CTL）によって認識される腫瘍抗原及び抗原性のあるペプチドをコードする多数の遺伝子が同定されてきており、抗原特異的腫瘍免疫療法の可能性が高まっている（Boon, T. 及び van der Bruggen, P., J. Exp. Med. 183, 725-729 (1996); Rosenberg, S. A., J. Natl. Cancer Inst. 88, 1635-1644 (1996)）。

$\alpha$ -フェトタンパク質（AFP）は、正常組織では胎生期にのみ発現するが、多くのHCCにおいて発現が再活性化されることが報告されている（Fujiyama, S. ら, Oncology 62, 57-63 (2002)）。またマウス及びヒトのT細胞レパートリーは、MHCクラスI分子により提示された AFP由来ペプチドエピトープを認識できる（Butterfield, L. H. ら, Cancer Res. 59, 3134-3142; Jr Vollmer, C. M. ら, Cancer Res. 59, 3064-3067 (1999); Butterfield, L. H. ら, J. Immunol. 166, 5300-5308 (2001)）。胎児の発達段階においてこの癌胎児性タンパク質に対して高い血漿レベルで曝されているにも関わらず、成熟T細胞は AFPに対して完全な免疫寛容（トレランス）を獲得することではなく、 AFP特異的なT細胞が末梢血

中に検出される。すなわち、癌胎児性タンパク質は免疫治療の標的となり得る。また、 AFP 及び PIVKA-II (Fujiyama, S. ら, Oncology 62, 57-63 (2002)) は HCC の周知の腫瘍マーカーである。

更に、研究者が遺伝子一発現プロファイルに関する包括的なデータを得ることを可能とする cDNA マイクロアレイ技術が急速に発展している。いくつかの研究によって、この技術が新規癌関連遺伝子の同定及び分子レベルにおけるヒト癌の分類に有用であることが証明されている (Golub, T. R. ら, Science 286, 531-537 (1999); Alizadeh, A. A. ら, Nature 403, 503-511 (2000); Ono, K. ら, Cancer Res. 60, 5007-5011 (2000); Kitahara, O. ら, Cancer Res. 61, 3544-3549 (2001); Kihara, C. ら, Cancer Res. 61, 6474-6479 (2001))。本発明者等は先に、23,040 種の遺伝子を含むゲノムワイドの cDNA マイクロアレイの使用によって、HCC の発生の際に発現が変化する遺伝子の同定を報告した。そして 20 種の原発性 HCC におけるこれらの遺伝子の発現プロファイルを検討した (Okabe, H. ら, Cancer Res. 61, 2129-2137 (2001))。

1996 年、Pilia らは、グリピカンファミリーのメンバーの 1 種をコードするグリピカン 3 (glypican-3; GPC3) 遺伝子が、Simpson-Golabi-Behmel 症候群 (SGBS) 患者において変異していることを報告した (Pilia, G. ら, Nat. Genet. 12, 241-247 (1996))。SGBS は出生前後の過成長、及び女性キャリアにおける非常に軽い表現型から男性乳児の致死的症状までの幅広い臨床症状によって特徴付けられる X 連鎖遺伝性疾患である (Neri, G. ら, Am. J. Med. Genet. 79, 279-283 (1998))。SGBS の臨床的特徴としては、特徴的な顔貌 (distinct facial appearance)、口蓋裂、合指、多指、副乳、嚢胞性及び異形成腎、先天性心欠陥等が挙げられる (Behmel, A. ら, Hum. Genet. 67, 409-413 (1984); Garganta, C. L. 及び Bodurtha, J. N., Am. J. Med. Genet. 44, 129-135 (1992); Golabi, M. 及び Rosen, L., Am. J. Med. Genet. 17, 345-358 (1984); Gurrieri, F. ら, Am. J. Med. Genet. 44, 136-137 (1992))。GPC3 変異のほとんどは点突然変異または幾つかのエクソンを含む小さな遺伝子の欠失であると報告されている (Hughes-Benzie, R. M. ら, Am. J. Med. Genet. 66, 227-234 (1996); Lindsay, S. ら, J. Med. Genet. 34, 480-483 (1997); Veugelers, M. ら, Hum. Mol. Genet. 9,

1321–1328 (2000); Xuan, J. Y. ら, *J. Med. Genet.* 36, 57–58 (1999))。また、患者の表現型と変異の位置に相関性がないことから、S G B S は機能的G P C 3 タンパク質の欠損と、家系内及び家系間の表現型の差を生み出す他の遺伝的要因によって引き起こされる可能性が挙げられており (Hughes-Benzie, R. M. ら, *Am. J. Med. Genet.* 66, 227–234 (1996))、G P C 3 欠損マウスの研究からも、この仮説に対する支持が得られている (Cano-Gauci, D. F. ら, *J. Cell Biol.* 146, 255–264 (1999))。これらのマウスはS G B S 患者に見られる、過成長、囊胞性及び異形成腎を含む異常のいくつかを有している。

癌に特異的に過剰発現し、種々の正常組織においては発現レベルが無視できる抗原は、免疫療法において理想的な標的である可能性がある。こうした場合、C T L は抗原を過剰発現する癌に対してのみ細胞傷害性を示し、正常な組織には副作用を示さないと期待できる。ノーザンプロット解析を用いた研究から、G P C 3 m R N A はH C C 、胎盤、胎児肝臓、胎児肺、胎児腎臓で過剰発現していることが報告されている (Zhu, Z. W. ら, *Gut* 48, 558–564 (2001); Hsu, H. C. ら, *Cancer Res.* 57, 5179–5184 (1997); Pellegrini, M. ら, *Dev Dyn.* 213, 431–439 (1998))。

また、G P C 3 には細胞増殖の阻害作用があり、ある種の腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導し得るため (Duenas Gonzales, A. ら, *J. Cell Biol.* 141, 1407–1414 (1998); Cano-Gauci, D. F. ら, *J. Cell Biol.* 146, 255–264 (1999))、G P C 3 発現が種々の起源の腫瘍において発現が抑制されているという報告がある。Lin らは、G P C 3 は正常な卵巣で発現しているが、ある種の卵巣癌細胞系においては検出できることを示した (Lin, H. ら, *Cancer Res.* 59, 807–810 (1999))。G P C 3 発現が見られない全てのケースにおいて、コード領域における変異はなく、G P C 3 プロモーターが過度にメチル化されており、また脱メチル化剤で処理することによってG P C 3 発現は回復した。更に、G P C 3 の異所性発現は数種の卵巣癌細胞系においてコロニー形成活性を阻害することが報告されている。G P C 3 と癌を関連付ける他のデータとしては、正常なラット中皮細胞と中皮腫細胞株との間のディファレンシャルm R N A ディスプレイ研究から得られたものがある (Murthy, S. S. ら, *Oncogene* 19, 410–416 (2000))。この研究において、G P C 3 は腫瘍細胞株において絶えず発現が抑制されていることが見出

された。更に、同様の発現抑制は原発性ラット中皮腫及びヒトの中皮腫由來の細胞株においても見られている。卵巣癌と同様に、G P C 3 コード配列中に変異は見出されていないが、ほとんどの細胞株でG P C 3 プロモーター領域に異常なメチル化が見られている。報告されているように (Duenas Gonzales, A. ら, J. Cell. Biol. 141, 1407-1414 (1998))、中皮腫細胞株におけるG P C 3 の異所性発現はコロニー形成活性を阻害することが示された。更に最近、Xiang らは、G P C 3 がヒトの乳癌においても発現していないことを報告した (Xiang, Y. Y. ら, Oncogene 20, 7408-7412 (2001))。これらのデータから、G P C 3 がこれらの癌における細胞増殖の負の調節因子として作用し得ることが示唆される。すなわち、G P C 3 の発現は成人のG P C 3 陽性組織から生じる癌における腫瘍の進行の間に低下し、この低下が悪性の表現型の発生において何らかの役割を果たしているように思われる。

反対に、H C Cの場合、腫瘍は胎児においてのみG P C 3 を発現する肝臓組織から生じ、G P C 3 発現は悪性への形質転換において再び現れる傾向がある。G P C 3 の再発現がこれらの腫瘍の進行において重要であるか否かは明らかでない。ここ数年の間に、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカン (H S P G) が線維芽細胞増殖因子 (F G F) 及びWnt等のヘパリン結合性成長因子の最適な活性の発現に必要であることが明らかとなった (Yayon, A. ら, Cell 64, 841-848 (1991); Schlessinger, J. ら, Cell 83, 357-360 (1995))。グリピカンはG P I アンカー型細胞表面H S P G のファミリーであり、腫瘍形成とG P C 3 の発現レベルの関係におけるこの組織特異的な差異は、G P C 3 が各組織ごとに異なった方法で成長と生存因子を調節しているためではないかと推測される。G P C 3 は少なくともこれらの臓器において癌胎児性タンパク質として働いているように思われる。一般に、癌胎児性タンパク質は腫瘍の進行において重要な役割を持つとはされていないが、腫瘍マーカーまたは免疫治療の標的として使用してきた (Coggin, J. H. Jr., CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology 5, 37-55 (1992); Matsuura, H. 及び Hakomori S.-I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 6517-6521 (1985))。G P C 3 の癌胎児性挙動が臨床的用途に利用し得るか否か、このグリピカンの再発現がH C Cの進行において重要であるか否かは、更に研究の余地があ

る。

HCCの治療法は様々なものがあるにも関わらず、他の癌に比べて予後が悪く、難治性癌のひとつになっている。HCCのベースに肝硬変があり、もともとの患者の肝機能が悪いことや、1個の癌を治療してもまた別の場所から癌が発生するという性質もその理由である。早急かつ新たな治療戦略が要求されている。HCCに特異的に高発現している抗原を標的にした免疫療法を開発できれば、自己の正常臓器に障害を及ぼすことなく、癌だけを有効に排除する治療法になる可能性がある。また、どんな末期の癌患者でも、肝機能が悪すぎて他の治療が行えない患者にでも使用できる治療法になり得る。また、現在日本ではHCC予備群であるC型肝炎感染者が200万人以上いるといわれている。これらの感染者のHCCの予防に対してもこのような免疫療法は使用できる可能性がある。HCCの腫瘍マーカーとして AFP 及び PIVKA-II が知られているが、患者によっては検出されない場合や、良性肝疾患である肝硬変や慢性肝炎の患者で偽陽性となる場合があり、特に早期のHCCの診断は難しいとされている。HCCの早期診断のためにも他に有用な腫瘍マーカーが必要である。

## 発明の開示

本発明者等は、cDNAマイクロアレイ解析データに基づいて、ヒト肝細胞癌において特異的に過剰発現している新規な癌胎児性タンパク質としてグリピカン3 (GPC3) を同定し、免疫治療のための標的抗原の潜在的な候補となり得る新規なペプチドを見出した。次いで本発明者等はHCC患者血清中に可溶性GPC3タンパク質を検出し、GPC3はHCCの新たな腫瘍マーカーとなり得ることを明らかにした。

すなわち、本発明は、以下の(1)～(18)を提供する。

- (1) 配列番号5～16のいずれかに示すアミノ酸配列からなるペプチド。
- (2) 配列番号5～16のいずれかに示すアミノ酸配列において1個または2個のアミノ酸が置換または付加されており、細胞傷害性T細胞の誘導能を有するペプチド。
- (3) N末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオ

ニンまたはトリプトファンである、上記（2）に記載のペプチド。

（4） C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである、上記（2）または（3）に記載のペプチド。

（5） 上記（1）～（4）のいずれかに記載のペプチドを1種以上含む、腫瘍の治療及び／または予防のための医薬。

（6） 上記（1）～（4）のいずれかに記載のペプチドとHLA分子とを含む複合体を表面に提示しているエキソソーム。

（7） HLA分子がHLA-A24である、上記（6）に記載のエキソソーム。

（8） HLA分子がHLA-A<sup>\*</sup>2402である、上記（7）に記載のエキソソーム。

（9） 上記（1）～（4）のいずれかに記載のペプチドを用いて細胞傷害性T細胞誘導能の高い抗原提示細胞を誘導する方法。

（10） グリピカン3（glypican-3；GPC3）タンパク質または上記（1）～（4）のいずれかに記載のペプチドを含むその部分ペプチドをコードする遺伝子を抗原提示細胞に導入することを含む、細胞傷害性T細胞誘導能の高い抗原提示細胞を誘導する方法。

（11） 上記（1）～（4）のいずれかに記載のペプチドを用いて細胞傷害性T細胞を誘導する方法。

（12） 上記（1）～（4）のいずれかに記載のペプチドを用いて誘導される、単離された細胞傷害性T細胞。

（13） HLA分子と上記（1）～（4）のいずれかに記載のペプチドとの複合体を提示する抗原提示細胞。

（14） 上記（9）または（10）に記載の方法によって誘導される、上記（13）に記載の抗原提示細胞。

（15） GPC3に対する抗体を含む、肝細胞癌（HCC）の診断剤。

（16） サンプルとGPC3に対する抗体を接触させることを含む、HCCの診断方法。

(17) 更にサンプル中のG P C 3を定量することを含む、上記(16)に記載の方法。

(18) G P C 3に対する抗体を含む、H C Cの診断のためのキット。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-245831 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、成人組織におけるG P C 3 m R N AのH C C特異的発現を示す。

20例のH C C及び種々の正常組織におけるヒトG P C 3 m R N Aの発現の相対比(R R)を示す。H C CにおけるR Rは各症例における腫瘍：非腫瘍の強度比を示す。正常組織におけるR Rは正常各組織：正常肝臓の強度比を示す。

図2は、ヒトH C C細胞株においてR T - P C Rによって検出されたG P C 3及び $\beta$ -アクチン(対照)のm R N Aの発現を示す。

レーン1：HepG2、レーン2：Hep3B、レーン3：PLC/PRF/5、

レーン4：SK-Hep-1、レーン5：HuH-7

図3は、G P C 3ペプチド(ペプチド(pep)1～12：配列番号5～16)で刺激し、更に増殖させたP B M Cを、6時間の<sup>51</sup>C r放出アッセイを用いてC T L活性について調べた結果の一部を示す。縦軸の値は3回のアッセイの平均値に基づいて計算した特異的細胞溶解率(%)を示す。H C C細胞株としてH L A-A<sup>24+</sup>G P C 3<sup>+++</sup>のHepG2、H L A-A<sup>24+</sup>G P C 3<sup>-</sup>のSK-Hep-1、H L A-A<sup>24-</sup>G P C 3<sup>+++</sup>のHep3B及びHuH-7を用い、患者1に対してペプチド1、3、7、または12で誘導したC T L、患者2に対してペプチド5、6、10、または11で誘導したC T L、患者3に対してペプチド2または12で誘導したC T L、患者4に対してペプチド1、2、3、4、7、または10で誘導したC T L、患者5に対してペプチド1、3、4、11、または12で誘導したC T L、患者6に対してペプチド6または9で誘導したC T L、患者7に対してペプチド4、5、6、8、9、11、または12で誘導したC T L、患者8に対してペプチド5、7、または10で誘導したC T Lの結果を示す。尚、横軸は

Effector/Target 比 (E/T 比)、すなわち癌細胞数に対する CTL 数の比を示す。

図 4 は、ウエスタンプロットを用いて HepG2 の培養上清における GPC3 タンパク質の存在を示す。

レーン 1、3、5、及び 7 : 6、12、24、及び 48 時間の培養後の HepG2 細胞  $1 \times 10^5$  個の溶解物

レーン 2、4、6、及び 8 : 6、12、24、及び 48 時間の培養後の HepG2 培養上清 20 μl

図 5 は、3 種類の HCC 細胞株 (Hep G2、Hep 3B および SK-Hep-1) の培養上清中に分泌される GPC3 タンパク質の ELISA による定量の結果を示す。HepG2 細胞  $1 \times 10^5$  個の 24 時間培養後の培養上清 1 ml 中の GPC3 タンパク質の濃度を 1 U/ml と定義した。

図 6 は、ウエスタンプロットによる HCC 患者血清中の可溶性 GPC3 タンパク質の検出を示す。

図 7 は、HCC 患者 28 名及び健康なドナー (HD) 54 名の血清中の GPC3 タンパク質の ELISA による定量の結果を示す。1.71 は、54 名の HD 由来の血清中の GPC3 タンパク質の平均値 + 3 SD として規定される、血清中の可溶性 GPC3 タンパク質の正常上限の値である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明者等は、Okabe, H. ら (Cancer Res. 61, 2129-2137 (2001)) に記載の方法を用い、cDNA マイクロアレイに基づいてヒト肝細胞癌において特異的に過剰発現している新規な癌胎児性タンパク質としてグリビカン 3 (GPC3) を同定した。血清中の GPC3 を検出した結果では、肝細胞癌以外の癌、例えば胃、食道、肺、乳房、すい臓、胆管、結腸等の癌では GPC3 は陰性であり、また、肝硬変、慢性肝炎等の良性の肝疾患においても陰性であることを確認した。更に本発明者等は、肝細胞癌の外科的治療後の患者において、術後の血清中 GPC3 が陰性になることも確認した。

ヒト GPC3 タンパク質のアミノ酸配列は公知であり、例えば GenBank のタンパク質データベースに Accession No. NP\_004475 として登録されており、当業者

であれば容易に入手することができる。本発明者等は次に、種々のタンパク質が *in vivo* において抗原提示細胞上に提示される場合に、9個のアミノ酸からなるペプチド（ノナペプチド）に分解されてから提示されることを考慮し、日本人全体の60%を占めるHLA-A24に対する結合モチーフを有するGPC3由來の9個のアミノ酸または10個のアミノ酸からなる部分ペプチドを合成した。

HLA-A24に対する結合モチーフを有するペプチドの選択は、例えば（J. Immunol., 152, 3913, 1994; J. Immunol. 155:4307, 1994）に記載の方法に基づいて行うことができる。HLA-A24以外のHLAの型についても同様にペプチドを選択することが可能である。あるいはまた、最近インターネット上で利用可能となっているソフトウェア、例えば Parker K. C., J. Immunol. 152, 1994に記載されているもの等を用いて、種々のペプチドとHLA分子（HLA抗原と呼ばれることがある）との結合親和性を *in silico* で計算することもできる。尚、HLA分子との結合親和性は、例えば上記のソフトウェアを利用することができる BIMAS:HLA Binding Prediction: [http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) (Parker, K. C. ら, J. Immunol., 152, 1994)、あるいは Nukaya, I., Int. J. Cancer, 80, 1999 等に記載の方法を用いて推定することができる。

9-mer 及び 10-mer ペプチドは、得られた GPC3 タンパク質の全アミノ酸配列に基づいて、任意の位置からのペプチドを合成して得ることができる。ペプチドの合成は、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。通常用いられる合成方法は、例えば、Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成、丸善（株）、1975; ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）、1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成、広川書店、1991 等の文献や、国際公開 WO99/67288 号等の公報に記載されている。HLA分子とペプチドとの実際の結合は、TAP欠損T2あるいはRMA-S細胞株に当該HLA遺伝子を発現させたトランسفェクタントとペプチドをインキュベートし、細胞表面に発現するHLAクラスI分子をフローサイトメーターで定量して測定することができる（例えば Immunol. Lett. 2002 Aug 1, 83(1):21-30; Immunogenetics, 44:233-241, 1996; Nature 346:321-325, 1990 を参照のこと）。

HLA分子としては、日本人の多く（60%）が保有しているA24型を用いることが有効な結果を得るために好ましく、更に好ましくはA\*2402等のサブタイプである。しかしながら、臨床においては、治療を必要とする患者のHLA分子の型を予め調べることにより、これとの結合親和性、あるいは抗原提示による細胞傷害性T細胞（CTL）誘導能の高いペプチドを適宜選択することができる。更に、結合親和性及びCTL誘導能の高いペプチドを得るために、天然に存在するGPC3部分ペプチドのアミノ酸配列に基づいて1個または2個のアミノ酸の置換または付加を行うこともできる。天然において提示されるペプチド以外にも、既にHLA分子に結合して提示されるペプチドの配列の規則性が知られているので（J. Immunol., 152, 3913, 1994; Immunogenetics. 41:178, 1995; J. Immunol. 155:4307, 1994）、得られたペプチドに対してこれらの規則性に基づいた改変を行っても良い。例えば、HLA-A24結合親和性の高いものはペプチドのN末端から2番目のアミノ酸をフェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンに置換したり、C末端のアミノ酸をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換したペプチドも好適に使用することができる。

しかしながら、ペプチドの配列が他の機能を有する内在性または外来性のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一となる場合には、自己免疫疾患等の副作用が生じたり、あるいは特定の物質に対するアレルギー症状を引き起こしたりする可能性があるため、利用可能なデータベースを用いてホモロジー検索を行い、他のタンパク質のアミノ酸配列と一致することを避けるのが好ましい。更に、ホモロジー検索において、アミノ酸が1個または2個異なるペプチドも存在しないことが明らかであれば、HLA分子との結合親和性及び／またはCTL誘導能を高めるための上記アミノ酸配列の改変もこのような問題を生じるおそれがない。

上記のようにしてHLA分子との結合親和性の高いペプチドは、癌ワクチンとして有効である可能性が高いことが予想されるが、高い結合親和性を有することを指標として選択した候補ペプチドについて、実際にCTL誘導能を有するか否かを検討することが必要である。CTL誘導能の確認は、例えばHLA分子を有する抗原提示細胞（例えばB-リンパ球、マクロファージ、樹状細胞）、具体的に

はヒト末梢血単核細胞由来の樹状細胞等を誘導し、ペプチドで刺激した後にCD8陽性細胞と混合し、標的細胞に対する細胞傷害活性を測定する。あるいはまた、Nakatsura, T. ら (Eur. J. Immunol. 32, 826–836 (2002)) に記載の方法に基づいてPBM Cからペプチド特異的CTLを誘導することができる。更に、反応系として、ヒトHLA分子を発現するように作製されたトランスジェニック動物(例えば、Hum. Immunol. 2000 Aug.; 61 (8): 764–79 Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A\*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response., BenMohamed L., Krishnan R., Longmate J., Auge C., Low L., Primus J., Diamond DJ. に記載のもの)を用いることもできる。細胞傷害活性は、例えば標的細胞を<sup>5</sup><sup>1</sup>C r等で放射標識し、標的細胞から遊離した放射活性から計算することができる。あるいはまた、ペプチドを負荷した抗原提示細胞の存在下でCTLが産生・放出したIFN-γ及び抗IFN-γモノクローナル抗体によって培地上に可視化されるスポットを測定することによって観察することもできる。

上記のようにしてペプチドのCTL誘導能を検討した結果、以下の配列番号5～16に示すアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれるノナペプチドまたはデカペプチドが特に高いCTL誘導能を有することが明らかとなった。

Ser-Phe-Phe-Gln-Arg-Leu-Gln-Pro-Gly-Leu (配列番号5)

Phe-Phe-Gln-Arg-Leu-Gln-Pro-Gly-Leu (配列番号6)

Met-Phe-Lys-Asn-Asn-Tyr-Pro-Ser-Leu (配列番号7)

Phe-Thr-Asp-Val-Ser-Leu-Tyr-Ile-Leu (配列番号8)

Lys-Phe-Ser-Lys-Asp-Cys-Gly-Arg-Met-Leu (配列番号9)

Trp-Tyr-Cys-Ser-Tyr-Cys-Gln-Gly-Leu (配列番号10)

Lys-Tyr-Trp-Arg-Glu-Tyr-Ile-Leu-Ser-Leu (配列番号11)

Glu-Tyr-Ile-Leu-Ser-Leu-Glu-Glu-Leu (配列番号12)

Ile-Tyr-Asp-Met-Glu-Asn-Val-Leu-Leu (配列番号13)

Ala-Tyr-Tyr-Pro-Glu-Asp-Leu-Phe-Ile (配列番号14)

Phe-Tyr-Ser-Ala-Leu-Pro-Gly-Tyr-Ile (配列番号15)

Arg-Phe-Leu-Ala-Glu-Leu-Ala-Tyr-Asp-Leu (配列番号16)

本発明は更に、配列番号 5～16 のいずれかに示すアミノ酸配列において 1 個または 2 個のアミノ酸が置換または付加されており、細胞傷害性 T 細胞の誘導能を有するペプチドも提供する。1 個または 2 個のアミノ酸の置換または付加は、他のタンパク質のアミノ酸配列との一致がない限りにおいて、CTL 誘導能を有し得る。特に、アミノ酸の置換として、N 末端から 2 番目のアミノ酸のフェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンへの置換、C 末端のアミノ酸のフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンへの置換は好適な例である。

上記の本発明のペプチドは、1 種または 2 種以上の組み合わせとして、生体内で CTL を誘導し得る癌ワクチンとして使用することができる。本発明のペプチドの投与により、抗原提示細胞の HLA 分子に当該ペプチドが高密度に提示され、提示されたペプチドと HLA 分子との複合体に対して特異的に反応する CTL が誘導され、標的細胞となるべき肝細胞癌細胞に対する攻撃力が高まる。あるいは、被験者から樹状細胞を取り出して本発明のペプチドで刺激することにより、細胞表面に本発明のペプチドを負荷した抗原提示細胞が得られ、これを再度被験者に投与することで被験者において CTL を誘導し、標的細胞に対する攻撃力を高めることができる。

すなわち、本発明は、本発明のペプチドを 1 種以上含む、腫瘍の治療または腫瘍の増殖・転移等の予防のための医薬を提供するものである。尚、*in vivo* 及び *in vitro* において、本発明のペプチドによる抗原提示細胞の刺激は、細胞に対して高濃度のペプチドを存在させることによって、当該細胞に予め負荷されているペプチドとの交換が生じ、容易に行われる。このため、HLA 分子との結合親和性はある程度以上高いことが必要とされる。

本発明の医薬は、本発明のペプチドを単独で直接投与しても良いが、通常用いられる製剤学的方法によって製剤化した医薬組成物として投与しても良い。その場合、本発明のペプチドの他に、通常医薬に用いられる担体、賦形剤等を適宜含むことができ、特に限定されるものではない。

本発明のペプチドを有効成分とする肝細胞癌の治療及び／または予防のための医薬は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントと共に投与したり、

他の抗癌剤等の有効成分と共に投与したり、また粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数  $\mu\text{m}$  のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、経口投与、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが利用でき、全身投与、あるいは目的となる腫瘍の近傍に局所投与しても良い。本発明のペプチドの投与量は、治療すべき疾患、患者の年齢、体重、投与方法等により適宜調整することができるが、通常 0.001mg～1000mg、好ましくは 0.001mg～1000 mg、より好ましくは 0.1 mg～10 mg であり、数日ないし数月に 1 回投与するのが好ましい。当業者であれば、適当な投与量を適宜選択することが可能である。

あるいはまた、本発明は、本発明のペプチドと HLA 分子との複合体を表面に提示している、エキソソームと呼ばれる細胞内小胞を提供する。エキソソームの調製は、例えば特表平 11-510507 号、及び特表 2000-512161 号に詳細に記載されている方法を用いて行うことができるが、好ましくは治療及び／または予防の対象となる被験者から得た抗原提示細胞を用いて調製する。本発明のエキソソームは、上記本発明のペプチドと同様に癌ワクチンとして接種することができる。

HLA 分子としては、治療及び／または予防を必要とする被験者の HLA 分子と同じ型のものであることが必要である。例えば、日本人の場合には HLA-A-24、特に HLA-A\*2402 とすると好適であることが多い。

本発明はまた、本発明のペプチドを用いた抗原提示細胞の誘導方法も提供する。樹状細胞を末梢血単球から誘導した後、in vitro または in vivo で本発明のペプチドと接触（刺激）させ、抗原提示細胞を誘導することができる。本発明のペプチドを被験者に投与した場合、被験者の体内で本発明のペプチドを負荷した抗原提示細胞が誘導される。あるいは、抗原提示細胞に本発明のペプチドを in vitro で負荷した後に被験者にワクチンとして投与することもできる。

本発明はまた、G P C 3 タンパク質または上記本発明のペプチドを含む、その部分ペプチドをコードする遺伝子を in vitro で抗原提示細胞に導入することを含む、細胞傷害性 T 細胞誘導能の高い抗原提示細胞を誘導する方法を提供する。導

入する遺伝子はDNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。導入の方法は当分野において通常行われるリポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法等の種々の方法を用いれば良く、特に限定するものではない。具体的には、例えばCancer Res., 56:5672, 1996; J. Immunol., 161:5607, 1998; J. Exp. Med., 184:465, 1996; 特表2000-509281号に記載のようにして行うことができる。遺伝子を抗原提示細胞に導入することによって、当該遺伝子は細胞中で転写、翻訳等の処理の後、得られたタンパク質がHLAクラスIまたはクラスIIのプロセッシング及び提示経路を経て、部分ペプチドが提示される。

本発明は更に、上記本発明のペプチドを用いてCTLを誘導する方法を提供する。本発明のペプチドを被験者に投与した場合、被験者の体内でCTLが誘導され、肝細胞癌細胞を標的とした免疫力が増強される。あるいは、被験者由来の抗原提示細胞及びCD8陽性細胞、または末梢血単核球をin vitroで本発明のペプチドと接触(刺激)させ、CTLを誘導してから被験者にもどすex vivoの治療方法にも用いることができる。

本発明は更に、本発明のペプチドを用いて誘導される、単離された細胞傷害性T細胞を提供する。本発明のペプチドを提示した抗原提示細胞による刺激に基づいて誘導された細胞傷害性T細胞は、好ましくは治療及び/または予防の対象である被験者由来のものであり、単独、または、本発明のペプチド、エキソソーム等を含む、他の医薬と共に抗腫瘍効果を目的として投与することができる。

本発明は更に、HLA分子と本発明のペプチドとの複合体を提示する抗原提示細胞を提供する。本発明のペプチド、あるいは本発明のペプチドを含むGPC3タンパク質、またはその部分ペプチドをコードする遺伝子との接触によって得られる当該抗原提示細胞は、好ましくは治療及び/または予防の対象である被験者由来のものであり、単独、または、本発明のペプチド、エキソソーム、細胞傷害性T細胞等を含む、他の医薬と共にワクチンとして投与することができる。

本発明は更に、GPC3に対する抗体を含む、肝細胞癌の診断剤を提供する。GPC3に対する抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれでも良く、当業者に公知の方法(例えば、「新生化学実験講座1,タンパク質I,389-406,東京化学同人」参照)により調製することが可能である。GPC3タンパク

質はアミノ酸配列が前記のように公知であり、当該アミノ酸配列に基づいて通常のタンパク質発現技術を用いて製造でき、また市販のもの (Santa Cruz, CA) を利用することも可能である。市販のG P C 3 を用いる場合は、必要に応じて SDS-Out<sup>TM</sup> (Sodium Dodecyl Sulfate Precipitation Reagent; PIERCE, Rockford, IL より購入) を用いて SDS を除いて使用することが好ましい。また G P C 3 の部分ペプチドは、G P C 3 のアミノ酸配列から適当な部分配列を選択し、通常のペプチド合成技術を用いて製造できる。

ポリクローナル抗体の調製は、まず、例えば、ウサギ、モルモット、マウス、ラット、ハムスター、ニワトリ、サルなどの動物に G P C 3 タンパク質またはその部分ペプチドを感作抗原として投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント (FIA や FCA) と共にに行ってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテイン A や固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。

一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、G P C 3 タンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレン glycol などを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。上記 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間継続する。次いで、目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。

また、本発明の抗体は、遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクタ

一で形質転換した宿主に産生させても良い。例えば、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990 参照）。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。次に、形質転換させた宿主細胞を *in vitro* または *in vivo* で培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。

モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテイン A や固定化抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる精製により行うことができる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる。

本発明で使用される抗体は、抗体の全体分子に限らず GPC3 に結合する限り、抗体の断片又はその修飾物であってもよく、二価抗体も一価抗体も含まれる。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、1 個の Fab と完全な Fc を有する Fab/c、または H鎖若しくは L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させた単鎖 Fv (scFv) が挙げられる。尚、本発明の目的のためには、抗体は GPC3 のいかなるエピトープを認識するものであっても良い。

診断剤としての正確性のためには、抗体はヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト型抗体は、例えば、マウスヒトキメラ抗体であれば、GPC3 タンパク質に対する抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、その H 鎖定常部をヒト IgE H 鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髓腫細胞に導入することにより調製できる。また、ヒト抗体は、免疫グロブリン遺伝子をヒトと

入れ換えたマウスにG P C 3 タンパク質を免疫することにより調製することができる。

本発明の診断剤において、限定するものではないが、抗体は例えば1 μg/mlの濃度で用いることができる。診断剤には上記G P C 3に対する抗体の他に、必要に応じて薬学的に許容される担体等を適宜含有させることができる。

本発明は更に、サンプルとG P C 3に対する抗体を接触させることを含む、肝細胞癌の診断方法を提供する。診断方法は、更にサンプル中のG P C 3を定量することを含み得る。本発明において、サンプルは、H C Cに罹患しているおそれのある被験者から得られる血清、唾液、尿等が挙げられるが、特に好ましくは血清である。サンプルと上記抗体との接触は、当分野において通常行われている方法に基づいて行えば良く、特に限定するものではない。診断は、例えばサンプルと上記抗体との接触の後、サンプル中に存在し得るG P C 3と抗体との特異的結合を、蛍光物質や発光物質、酵素等で標識した二次抗体等を使用して定量的に検出することにより行うことができる。また、診断のための反応をウェル等の液相中で行っても良く、あるいはG P C 3に対する抗体を固定した固相支持体上で行っても良い。この場合、H C Cに罹患していない正常なサンプル、あるいはH C Cであることが判明しているサンプルを用いて予め作製した標準値と比較することによって、測定された値がH C C陽性であるか否かを判定することができる。また、診断の際には、多数のH C C患者と健常人の血清中G P C 3量を測定して、カットオフ値を設定することが好ましい。

本発明の診断方法は、H C Cに罹患しているか否かの診断に用いることができる他、H C Cに対する治療の効果を確認するために経時的に行うことともできる。

更に本発明は、G P C 3に対する抗体を含む、H C Cの診断のためのキットを提供する。当該キットには、G P C 3に対する抗体の他、二次抗体、定量のための標準サンプル、バッファー等を含めることができる。

以下、実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] H C Cで特異的に過剰発現するG P C 3 遺伝子の同定

cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現のプロファイリングは先に報告したように行つた (Okabe, H. ら, Cancer Res. 61, 2129-2137 (2001))。肝切除術を行つた20名の患者から、原発性HCC及び対応する非癌性肝臓組織を得た。そのうち10例はB型肝炎表面抗原陽性、10例はC型肝炎ウイルス (HCV) 陽性であり、HBV及びHCVの双方に感染している例はなかつた。HBV陽性及びHCV陽性のもので、年齢、性別、分化の程度、血管の浸潤、腫瘍の段階に関して有意な差異はなかつた。National Center for Biotechnology Information の UniGene データベースから選択した 23,040 種の cDNA を含む「ゲノムワイドの」cDNAマイクロアレイを作製した。HCC及び対応する非癌性肝臓組織間での発現プロファイルを比較してHCCにおいて特異的に過剰発現している遺伝子を探査し、その結果、HCC患者に対する免疫治療の候補であり、おそらくは理想的な標的であり得るGPC3を同定した。20例のHCC中16例において、癌組織におけるGPC3 mRNAの発現は非癌性組織における発現よりも5倍以上高かつた(図1)。すなわち、GPC3はほとんどのHCCにおいて過剰発現しており、B型肝炎ウイルス (HBV) またはHCV感染とは関連していなかつた。一方、GPC3 mRNAは胎盤、胎児肝臓、胎児肺、及び胎児腎臓において高発現しており、成人の正常組織のほとんどで発現が低かつた(図1)。これらのGPC3に関するデータは、ノーザンブロッティング研究に基づいて公表されているものと一致した (Zhu, Z. W. ら, Gut 48, 558-564 (2001); Hsu, H. C. ら, Cancer Res. 57, 5179-5184 (1997); Pellegrini, M. ら, Dev Dyn. 213, 431-439 (1998))。この結果から、GPC3は $\alpha$ -フェトタンパク質 (AFP) と同様に、HCCにおける新規な癌胎児性抗原であることが明らかとなつた。

#### [実施例2] ヒトHCC細胞系におけるGPC3 mRNA及びHLA-A24の発現

CTLアッセイのための標的HCC細胞系を選択するために、逆転写-PCR (RT-PCR) を用いたGPC3 mRNA発現、抗HLAクラスI (w6/32、IgG2a) または抗HLA-A24 (IgG2) モノクローナル抗体 (VERITAS、東京)、及びFITCコンジュゲートヤギ抗マウスIgG (ICN/CAPPEL、Aurora、OH) を用いた免疫染色及びフローサイトメトリーによるHLA-クラスI及び-A24の発

現を検討した。HCC細胞系である Hep G2、Hep 3B、PLC/PRF/5、及び HuH-7 は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。また SK-Hep-1 は久留米大学の K. Itoh 博士よりご供与頂いた。

RT-PCR は公知の方法（例えば Nakatsura, T. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 936-944 (2001)）に従って行った。939bp の断片を増幅する GPC 3 遺伝子特異的 PCR プライマーを設計し、これを用いて 94°C、5 分の初期変性、及び 58°C のアニーリング温度での 30 増幅サイクルからなる RT-PCR 反応を行った。用いた GPC 3 PCR プライマー配列は、

センス : 5'-GTTACTGCAATGTGGTCATGC-3' (配列番号 1)

アンチセンス : 5'-CTGGTGCCAGCACATGT-3' (配列番号 2) であり、

対照実験のための β-アクチン PCR プライマー配列は、

センス : 5'-CCTCGCCCTTGCCGATCC-3' (配列番号 3)

アンチセンス : 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3' (配列番号 4) である。

対照である β-アクチン mRNA による標準化の後、HCC 細胞系における GPC 3 mRNA の発現を比較した。

その結果、HepG2、Hep3B、及び HuH-7 HCC 細胞系において GPC 3 mRNA の強い発現が示され、PLC/PRF/5 細胞系において中程度の発現が示されたが、SK-Hep-1 ではそのような発現は見られなかった（図 2）。尚、HepG2 及び SK-Hep-1 は HLA-A24 を発現したが、Hep3B 及び HuH-7 は発現しなかった。

[実施例 3] 末梢血単核球（PBMC）の刺激による腫瘍応答性 CTL の誘導先行技術（Kubo, R.T. ら, J. Immunol. 152, 3913-3924 (1994)）に基づいて、HLA-A24 分子に結合することが予想される GPC 3 由来ペプチドを探索し、12 種の異なるペプチドを合成して使用した（表 1）。これらのペプチドは、Fmoc/PyBOP 法を用いて合成したものであり（後記参考例 1～12 を参照のこと）、biologica（東京）から購入した。ペプチドの純度は、HPLC でいずれも 95% を越えることが確認された。

表1 GPC3ペプチドで刺激したHLA-A24陽性のHCC患者のPBMCからHLA-A24拘束性肝細胞癌反応性CTLの誘導率

No.	位置	配列	結合スコア <sup>a</sup>	ペプチドによるPBMCからのCTLの誘導							
				HLA-A24陽性 HCC患者				各ペプチドの CTL誘導率			
1	2	3	4	5	6	7	8				
1	GPC3 40-49	SFFQRLQPGL	24	- <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	3/8
2	GPC3 41-49	FFQRLQPGL	36	-	-	+	+	-	-	-	2/8
3	GPC3 129-137	MFKNNNYPSL	20	+	-	-	+	-	-	-	3/8
4	GPC3 148-157	FTDVSLYL	24	-	-	+	+	-	+	-	3/8
5	GPC3 247-256	KFSKDCGGRML	40	-	+	-	-	-	+	+	3/8
6	GPC3 260-268	WYCSYQCQL	240	-	+	-	-	-	+	+	3/8
7	GPC3 294-303	KYWREYILSL	400	+	-	-	+	-	-	-	3/8
8	GPC3 298-306	EYILSLEEL	330	-	-	-	-	-	+	-	1/8
9	GPC3 313-321	IYDMENVLL	200	-	-	-	-	-	+	+	2/8
10	GPC3 360-368	AYPEPDLF	60	-	+	-	+	-	-	-	3/8
11	GPC3 401-409	FYSALPGYI	60	-	+	-	-	+	-	+	3/8
12	GPC3 521-530	RFLAELAYDL	72	+	-	+	-	+	-	+	4/8
各患者のCTL誘導率				4/12	4/12	2/12	6/12	5/12	2/12	7/12	3/12

<sup>a</sup>, 各配列を有する分子の解離の半減期の評価(BIMAS: HLA Binding Prediction; Dr. Kenneth Parkerの研究より: [http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) )<sup>b</sup>, +はペプチド特異的でかつHLA-A24+腫瘍細胞に応答性のCTLの誘導が成功したことを示す。

インフォームドコンセントを得た後、熊本大学医学部外科学第二講座において治療中の HLA-A24<sup>+</sup> HCC 患者から血液サンプル 30 ml を得、先に報告したように (Nakatsura, T. ら, Eur. J. Immunol. 32, 826-836 (2002))、Ficoll-Conray 密度勾配遠心法によって PBMC を単離した。HLA-A24 結合モチーフを有する glypican-3 由来のペプチド 12 種 (表 1、No. 1 ~ 12 : 配列番号 5 ~ 16 に対応) について、8 名の HLA-A24<sup>+</sup> HCC 患者 (Pt 1 ~ 8) から得た PBMC から HLA-A24 拘束性で、かつ腫瘍応答性の CTL を誘導する能力について検討した (図 3、表 1)。PBMC からペプチド特異的 CTL を誘導する方法は、先に報告した方法 (Nakatsura, T. ら, Eur. J. Immunol. 32, 826-836 (2002)) を用いた。CTL の表面表現型は FITC-コンジュゲート抗-CD3、-CD4、または-CD8 モノクローナル抗体 (ニチレイ、東京) を用いた直接免疫蛍光染色によって検討した。エフェクター細胞及び HLA 拘束性を決定するために、培養開始時に各 20 μg / ml の抗-HLA-クラス I (W6/32, IgG2a)、抗-HLA-A24 (0041HA, IgG2a)、抗-CD8 (Nu-Ts/c, IgG2a)、抗-HLA-DR (H-DR-1, IgG2a)、及び抗-CD4 (Nu-Th/I, IgG1) モノクローナル抗体を添加した。アイソタイプが合った対照として、抗-CD13 (MCS-2, IgG2a) 及び抗-CD14 (JML-H14, IgG1) モノクローナル抗体を使用した。3 ~ 4 週間後、これらの CTL 株の数は PBMC の培養前の数と比較して約 10 倍に増加した。次にこれらの CTL 株の HCC 細胞株に対する細胞傷害活性を 6 時間の <sup>5</sup>Cr 放出アッセイによって検討した。結果を図 3 及び表 1 に示す。96 種中 33 種 (34.4%) の CTL 株が、HLA-A24<sup>-</sup> GPC3<sup>+</sup> の Hep3B 及び HuH-7、及び HLA-A24<sup>+</sup> GPC3<sup>-</sup> の SK-Hep-1 に対してよりも、HLA-A24<sup>+</sup> GPC3<sup>+</sup> の HepG2 に対して強い細胞傷害性を示した。この細胞傷害性はペプチド特異性を示し、抗-HLA-クラス I、抗-CD8 または抗-HLA-A24 モノクローナル抗体によって阻害されることから、これらの T 細胞応答が HLA-A24 拘束性の CD8<sup>+</sup> CTL によって担われていることが示される。各ペプチドまたは各患者における CTL の誘導率を表 1 に示す。これらの結果から、GPC3 由来の 12 種のペプチドの全てが CTL 誘導能を有し、HLA-A24 拘束性の GPC3 由来ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup> CTL 株が 8 名の HCC

C患者の全員において誘導されたことが示される。

#### [実施例4] HCCにおけるGPC3タンパク質の発現

4名のHCC患者から切除した肝臓組織周辺のHCC及び非癌性領域におけるGPC3のウエスタンブロッティング解析及び免疫組織化学分析を行った。

ウエスタンブロッティングは以下のように行った。サンプルを適量の溶解用バッファー(150 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.4、1% Nonidet P-40、1 mM オルトバナジウム酸ナトリウム(和光純薬工業(株))、1 mM EDTA、及びプロテアーゼ阻害剤タブレット(Amersham, Arlington Heights, IL))中で溶解した。溶解物の上清をSDS-PAGEゲル上で電気泳動し、ニトロセルロース膜(Bio-Rad, Hercules, CA)にトランスファーした。5%脱脂乳、0.2%Tween20を含有するTris緩衝生理食塩水中でブロッキングした後、この膜を、GPC3 303-464のアミノ酸に対応する組換えタンパク質に対して作製された抗-GPC3ウサギポリクローナル抗体(Santa Cruz, California)と共にインキュベートし、PBSでよく洗浄し、ペルオキシダーゼコンジュゲート抗-ウサギIg、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合F(ab')<sub>2</sub>断片(ロバ由来)(Amersham)を用い、ECLキット(Amercham)を使用して化学発光検出を行った。

免疫組織化学分析は、当分野において公知の方法に従って行った(Nakatsura, T.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 936-944 (2001))。OCT包埋用化合物に包埋した厚さ4 μmの組織サンプル切片を1:200に希釈した抗-GPC3抗体と共に染色した。陽性対照のために45kDaタグ付き融合タンパク質として大腸菌から産生されるGPC3 303-464(Santa Cruz, CA)及び抗-glypican-3ウサギポリクローナル抗体のビオチン化のためにFluoReporter Mini-Biotin-XX Protein Labeling Kit(F-6347)(Molecular Probes, Inc., Eugene)を使用した。

96ウェルのELISAプレート(Nunc, Denmark)を4°Cで一晩、PBS、pH 7.4中0.1 μg/ウェルの抗ヒトGPC3 303-464(Santa Cruz)でコートした。次いで、4%ウシ血清アルブミン/PBSを用い、室温で1時間、プレートをブロッキングした。陽性対照の標準サンプル及び培養上清をビオチン化抗-GPC3抗体と共に添加し、室温で2時間インキュベーションした。PBSで3回洗浄した後、各ウェルにHRP-コンジュゲートストレプトアビシン(ENDOGEN,

Woburn) を添加した。30分のインキュベーションの後、プレートをPBSで3回洗浄し、TMB基質溶液(ENDOGEN)を添加した。解析のためにELISAリーダー(モデル550、Bio-Rad)を405nmで用いた。

インフォームドコンセントを得た後、熊本大学医学部外科学第二講座において治療中のHCC患者から組織サンプルを得た。4種の腫瘍全てにおいて、GPC3タンパク質の発現がHCC細胞において非癌性肝細胞と同程度に低いという同様の結果が得られた。従って、HCC細胞中におけるGPC3 mRNA発現とGPC3タンパク質発現の間に矛盾が生じる。GPC3はGPI-アンカー型膜タンパク質であり、分泌タンパク質である可能性が報告されている(Filmus J., Glycobiology 11, 19R-23R (2001))。そこで、次に分泌されたGPC3タンパク質の検出を試みた。

#### [実施例5] HCC細胞株の培養上清及びHCC患者血清中における可溶性GPC3タンパク質の検出

HepG2の培養上清中に可溶性GPC3タンパク質が存在するか否かを検討するために、所定の培養期間の後に回収したHepG2細胞溶解物及び培養上清についてウエスタンブロッティングを行った。無血清培地における6、12、24、及び48時間の培養後に $1 \times 10^5$ 個のHepG2細胞から調製した細胞溶解物は、同様の量の60kDaのGPC3タンパク質の存在を示した(図4のレーン1、3、5、及び7)。一方、6、12、24、及び48時間の培養後のHepG2培養上清(1ml/ウェルの $20\mu l$ )では60kDaのGPC3タンパク質が漸増しており、GPC3タンパク質がHepG2から培養上清中に分泌されたことを示した。

次いで、抗-GPC3 303-464抗体及びビオチン化抗-GPC3抗体を用いて酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)による検出を行った。GPC3 303-464に対応する市販の組換えタンパク質を用い、ELISA系におけるGPC3の定量の精度を確認した。HepG2培養上清の連続希釈を用い、ODデータに基づいてGPC3タンパク質を定量する標準曲線を評価した。 $1 \times 10^5$ 個のHepG2細胞を24時間培養した後の培養上清1ml中のGPC3タンパク質の濃度を1U/mlと定義した。HepG2培養上清中のGPC3タンパク質の量はHep3Bよりも多く、一方SK-Hep-1においては検出できなかった(図5)。

次に、HCC患者血清中の可溶性GPC3タンパク質の検出を行った（図6）。28名のHCC患者から血液サンプルを採取し、医療記録から患者のプロファイルを集めてUICC TNM分類に基づいて臨床段階を決定した。患者7（Pt7、図6のレーン3）の血清 $20\mu l$ 中に60kDaのGPC3タンパク質のバンドが検出されたが、他の2名のHCC患者及び4名の健康なドナーの血清からは検出されなかった。次に28名のHCC患者及び54名の健康なドナー（HD）の血清中のGPC3タンパク質の量をELISAによって評価した（図7）。54名のHD血清中のGPC3タンパク質の平均は $0.75U/m l$ であり、標準偏差（SD）は0.32であった。男女間で発現に差はなく、従って卵巣でのGPC3の弱い発現は、この系について無視できると考えられた。28名のHCC患者の平均値は $1.98U/m l$ であった。血清中のGPC3タンパク質の正常上限値を決定するために、54名のHD血清のGPC3タンパク質の平均+3SDとして1.71を規定した。HCC患者の35.7%（10/28）、HDの0%（0/54）がGPC3タンパク質陽性(>1.71)であった。HCC患者血清中のGPC3タンパク質の濃度は、HDにおける濃度よりも有意に高かった（ $P<0.0001$ ）。患者4、5及び7についてELISAで評価したGPC3の濃度は、図6に示すようにそれぞれ0.94、1.73、及び69.4U/m lであった（表2）。すなわち、ウエスタンブロッティングでは69.4U/m lのGPC3タンパク質は検出できるが、1.73U/m lのGPC3は検出できなかった。

表2の結果から明らかなように、10名のGPC3—陽性患者のうち2名（患者6及び25）はAFP及びPIVKA-IIの双方が陰性であり、その一方の患者（患者6）は比較的初期のUICCステージIIとして分類された。すなわち、AFP及びPIVKA-IIの双方が陰性の患者においてGPC3が陽性となる場合があることから、GPC3はHCCの新規な腫瘍マーカーとして有用であることが明らかとなつた。

表2 HCC患者28例の血清中のAFP, PIVKA-IIとGPC3の測定結果

Pt ID	年齢(y)	性別	ウイルス <sup>a</sup>	UICC Stage	AFP(ng/ml) <sup>b</sup> (<20) <sup>c</sup>	PIVKA-II(mAU/ml) <sup>d</sup> (<40)	GPC3(U/ml) <sup>d</sup> (<1.71)
3	56M		HBV	IVA	54 <sup>e</sup>	957	1.73
5	71M		HCV	IIIB	8900	31577	1.73
11	69M	非B, 非C		IVA	9400	319	3.23
1	64M		HCV	IIIA	50	15	9.40
2	53M		HCV	II	45	38	2.98
8	69M		HCV	III	21	21	2.22
9	73M		HCV	IIIA	25	242	1.18
12	61M		HCV	IVA	349	169	1.49
17	70M		HBV	IVA	56	133	0.52
18	71F		HBV	II	930	994	0.38
19	77M		HCV	II	163	96	0.42
24	50M		HCV	II	29	41	0.28
26	63M		HBV	IVA	5280	1549	0.87
4	69M		HCV	IIIA	178	28	0.94
15	67M		HCV	II	100	32	0.83
22	72M		HCV	IIIA	25	12	1.67
7	62M		HCV	IVA	10	239	69.39
16	72M		HCV	II	<1	840	1.94
14	62M		HCV	II	3	69	0.90
20	75F	非B, 非C		IIIA	<1	63	0.35
27	71M		HCV	IVA	10	19288	0.83
6	72F		HCV	II	9	20	3.09
25	63M		HCV	IVB	<1	<10	62.45
10	58M	非B, 非C		IIIA	3	18	0.66
13	69M		HCV	IVB	6	<10	1.53
21	71M	HBV, HCV		IVA	2	26	0.52
23	59M		HBV	IIIA	3	18	1.70
28	69M		HCV	IIIA	<1	28	0.80

<sup>a</sup>, HCV はRT-PCR を用いて検出した。 HBsAg はラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて調べた。<sup>b</sup>, AFP はRIA を用いて定量した。<sup>c</sup>, 括弧内の値はカットオフインデックスを示す。<sup>d</sup>, PIVKA-II およびGPC3はエンザイムイムノアッセイ (EIA) を用いて定量した。<sup>e</sup>, 陽性の測定値に下線を付した。

[参考例1] Ser-Phe-Phe-Gln-Arg-Leu-Gln-Pro-Gly-Leu (配列番号5) の合成  
 開始レジンとして Fmoc-Leu-Wang resin (100–200mesh) を用いて後記スケジュールAに従って合成を開始し、工程5まで進んだ後、工程2へ戻ることでαアミノ基の脱保護、洗浄、カップリング、洗浄を繰り返し、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH を順次カップリングさせた結果、ペプチド結合樹脂を得た。ペプチドは工程6に示す試薬との反応によって樹脂か

ら切り離され、冷メチルタートブチルエーテル (MTBE) 中にろ過され、沈殿させた。沈殿したペプチドは2回冷 MTBE で洗浄され、窒素下で凍結乾燥された。

表 3

## スケジュールA

工程		時間 (分)	x	処理
				回数
1 .	(洗浄)	DMF		2
2 .	(脱保護)	20%ピペリジン/DMF 10ml	5	x 1
		20%ピペリジン/DMF 10ml	30	x 1
3 .	(洗浄)	DMF		4
		DCM		1
4 .	(カップリング)	各 $\alpha$ アミノ基保護アミノ酸 1mmole	30	x 1
		/ 0.45M HBTU/HOBt 2.1ml (1mmole), DIEA 348 $\mu$ l (2mmole)		
5 .	(洗浄)	DMF		4
		DCM		1
6 .	(クリーベッジ)	5% H <sub>2</sub> O	120	x 1
		5% フェノール		
		3% チオアニソール		
		3% エタンジチオール		
		3% トリイソプロピルシレン		
		81% TFA		
7 .	(沈殿)	MTBE		
8 .	(洗浄)	MTBE		
9 .	(凍結乾燥)			

得られた粗ペプチドは BioCad 60 (Perkin-Elmer, Foster City CA)により、粒子サイズ 10 ミクロンの C18 カラム (Phenomenex, Torrance, CA) を用いて逆相 HPLC

法によって精製された。流速 20ml/min, 45 分で 10%B から 80% B(溶媒 A: 0.05% TFA/H<sub>2</sub>O, 溶媒 B: 0.05% TFA/アセトニトリル)の直線濃度勾配で溶出し、溶出液を A220nm でモニターした。面積割合で 90 %以上を占める主ピークの質量分析を Lasermat 2000 (Finnigan Mat, San Jose, CA) を用い、MALDI-TOF 法で行なった結果、理論値 [MH<sup>+</sup>] 1109.3 に対し、実測値 1109.9 を得た。

[参考例 2] Phe-Phe-Gln-Arg-Leu-Gln-Pro-Gly-Leu (配列番号 6) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu-Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Phe-OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>+</sup>] 1131.3 に対し、実測値 1130.4 を得た。

[参考例 3] Met-Phe-Lys-Asn-Asn-Tyr-Pro-Ser-Leu (配列番号 7) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu-Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Met-OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>+</sup>] 1031.2 に対し、実測値 1032.3 を得た。

[参考例 4] Phe-Thr-Asp-Val-Ser-Leu-Tyr-Ile-Leu (配列番号 8) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu-Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asp(Otbu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>+</sup>] 1121.3 に対し、実測値 1122.1 を得た。

[参考例 5] Lys-Phe-Ser-Lys-Asp-Cys-Gly-Arg-Met-Leu (配列番号 9) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu-Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Asp(Otbu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>+</sup>] 1108.3 に対し、実測値 1111.4 を得た。

[参考例 6] Trp-Tyr-Cys-Ser-Tyr-Cys-Gln-Gly-Leu (配列番号 10) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu-Wang resin を開始レジンとして用い、

Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>+</sup>] 1114.3 に対し、実測値 1115.7 を得た。

[参考例 7] Lys-Tyr-Trp-Arg-Glu-Tyr-Ile-Leu-Ser-Leu (配列番号 1 1) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu-Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Glu(0tbu)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>-</sup>] 1104.3 に対し、実測値 1105.3 を得た。

[参考例 8] Glu-Tyr-Ile-Leu-Ser-Leu-Glu-Glu-Leu (配列番号 1 2) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu-Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc-Glu(0tbu)-OH、Fmoc-Glu(0tbu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Glu(0tbu)-OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>+</sup>] 1371.6 に対し、実測値 1370.7 を得た。

[参考例 9] Ile-Tyr-Asp-Met-Glu-Asn-Val-Leu-Leu (配列番号 1 3) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu-Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Glu(0tbu)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asp(0tbu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>+</sup>] 1211.4 に対し、実測値 1213.4 を得た。

[参考例 10] Ala-Tyr-Tyr-Pro-Glu-Asp-Leu-Phe-Ile (配列番号 1 4) の合成

Fmoc-Ile-Wang resin を開始レジンとして用い、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Asp(0tbu)-OH、Fmoc-Glu(0tbu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ala-OH を順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>-</sup>] 1216.4 に対し、実測値 1217.4 を得た。

[参考例 11] Phe-Tyr-Ser-Ala-Leu-Pro-Gly-Tyr-Ile (配列番号 1 5) の合成

[参考例 10] と同様に Fmoc-Ile-Wang resin (100-200 mesh) を開始レジンと

して用い、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OHを順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>+</sup>] 1193.4 に対し、実測値 1196.8 を得た。

[参考例 12] Arg-Phe-Leu-Ala-Glu-Leu-Ala-Tyr-Asp-Leu (配列番号 16) の合成

[参考例 1] と同様に Fmoc-Leu Wang resin を用い、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OHを順次結合させた。

質量分析の結果、理論値 [MH<sup>-</sup>] 1183.5 に対し、実測値 1186.7 を得た。

#### 産業上の利用の可能性

本発明者等は、癌胎児性タンパク質である GPC3 由来の 12 種のペプチドを、HLA-A24<sup>+</sup> HCC 患者の免疫療法の標的候補として同定した。HCC 患者における GPC3 の過剰発現に関わらず、成人の正常臓器においては、胎盤を除き、GPC3 の発現は顕著に低く、GPC3 が HCC の免疫療法の理想的な標的であり得ることが判明した。また、本発明の方法は、HCC に罹患しているか否かを診断するために非常に有用な方法であることが示された。本発明者等は更に HLA-A24 拘束性であり、かつ HCC 反応性の CTL を調製することができる GPC3 由来のペプチドを同定した。HLA-A24 アレルは日本人全体の 60% が保有し、その 95% の遺伝子型は A\*2402 である。コーカサス人では 20%、アフリカ人では 12% である (Tokunaga, K. ら, Immunogenetics 46, 199-205 (1997); Imanishi, I. ら, Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop and Conference (Tsujii, K. ら編) 1065-1220 (Oxford University Press, Oxford, 1992))。これらの結果から、GPC3 は、世界中の多くの HCC 患者に対する特異的な免疫治療または癌診断及び予防における用途に対して非常に有用であることが明らかとなった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として

本明細書にとり入れるものとする。

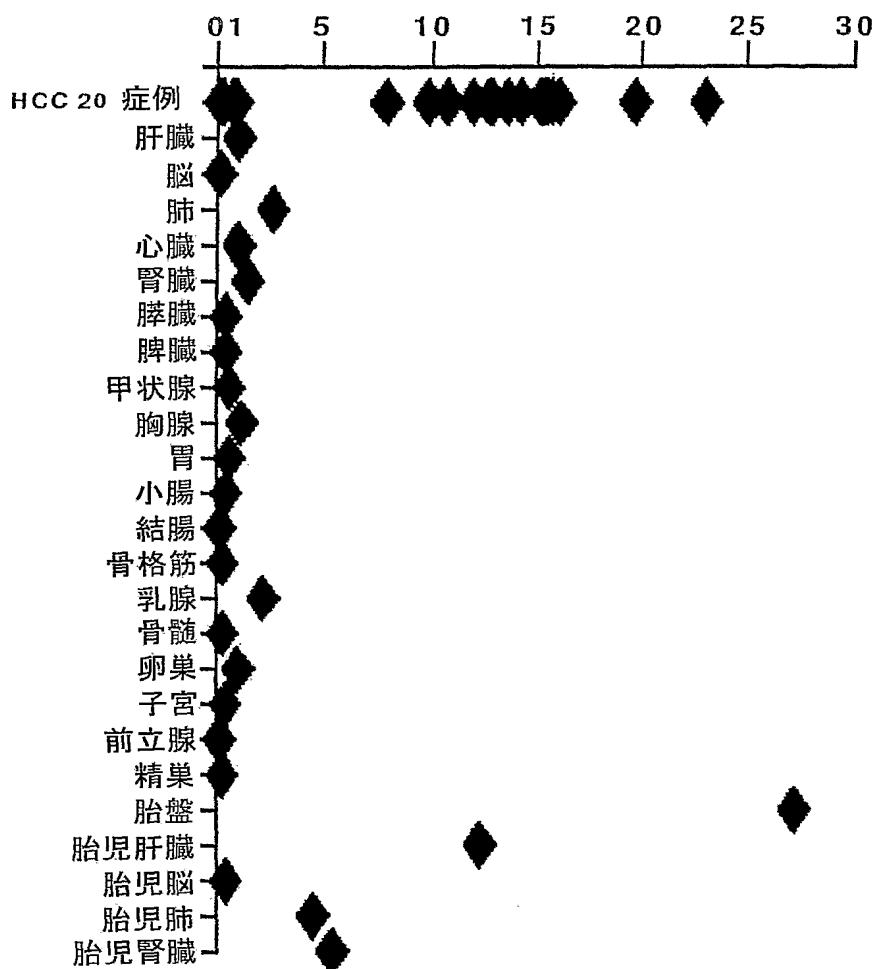
## 請求の範囲

1. 配列番号 5～16 のいずれかに示すアミノ酸配列からなるペプチド。
2. 配列番号 5～16 のいずれかに示すアミノ酸配列において 1 個または 2 個のアミノ酸が置換または付加されており、細胞傷害性 T 細胞の誘導能を有するペプチド。
3. N 末端から 2 番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンである、請求項 2 に記載のペプチド。
4. C 末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである、請求項 2 または 3 に記載のペプチド。
5. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを 1 種以上含む、腫瘍の治療及び／または予防のための医薬。
6. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のペプチドと HLA 分子とを含む複合体を表面に提示しているエキソソーム。
7. HLA 分子が HLA-A24 である、請求項 6 に記載のエキソソーム。
8. HLA 分子が HLA-A\*2402 である、請求項 7 に記載のエキソソーム。
9. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを用いて細胞傷害性 T 細胞誘導能の高い抗原提示細胞を誘導する方法。
10. グリビカン 3 (glypican-3 ; GPC3) タンパク質または請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含むその部分ペプチドをコードする遺伝子を抗原提示細胞に導入することを含む、細胞傷害性 T 細胞誘導能の高い抗原提示細胞を誘導する方法。
11. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを用いて細胞傷害性 T 細胞を誘導する方法。
12. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを用いて誘導される、単離された細胞傷害性 T 細胞。
13. HLA 分子と請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のペプチドとの複合体を提示する抗原提示細胞。

- 1 4 . 請求項 9 または 10 に記載の方法によって誘導される、請求項 13 に記載の抗原提示細胞。
- 1 5 . G P C 3 に対する抗体を含む、肝細胞癌 (H C C) の診断剤。
- 1 6 . サンプルと G P C 3 に対する抗体を接触させることを含む、H C C の診断方法。
- 1 7 . 更にサンプル中の G P C 3 を定量することを含む、請求項 16 に記載の方法。
- 1 8 . G P C 3 に対する抗体を含む、H C C の診断のためのキット。

**図 1**

成人正常肝臓の GPC 3 m RNA の発現を1とした各正常臓器での発現の相対比  
HCC 20 例の場合は、それぞれの非癌部肝臓の発現を1とした発現の相対比



## 図2

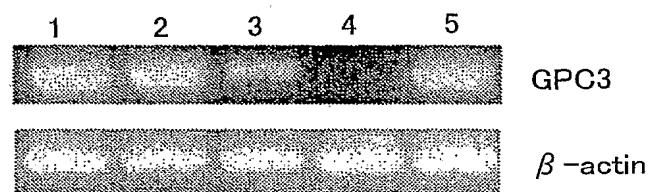


図3

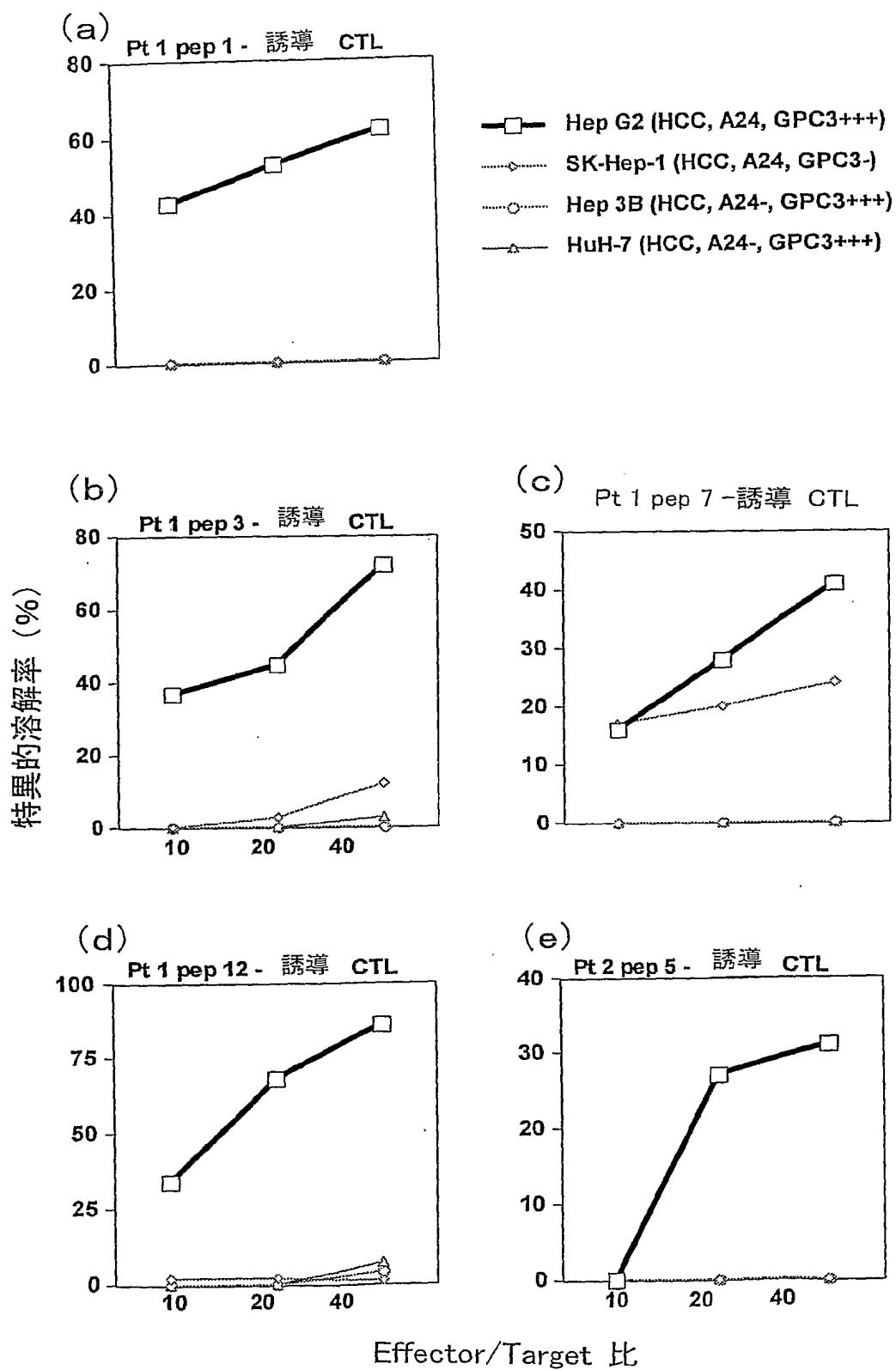


図3

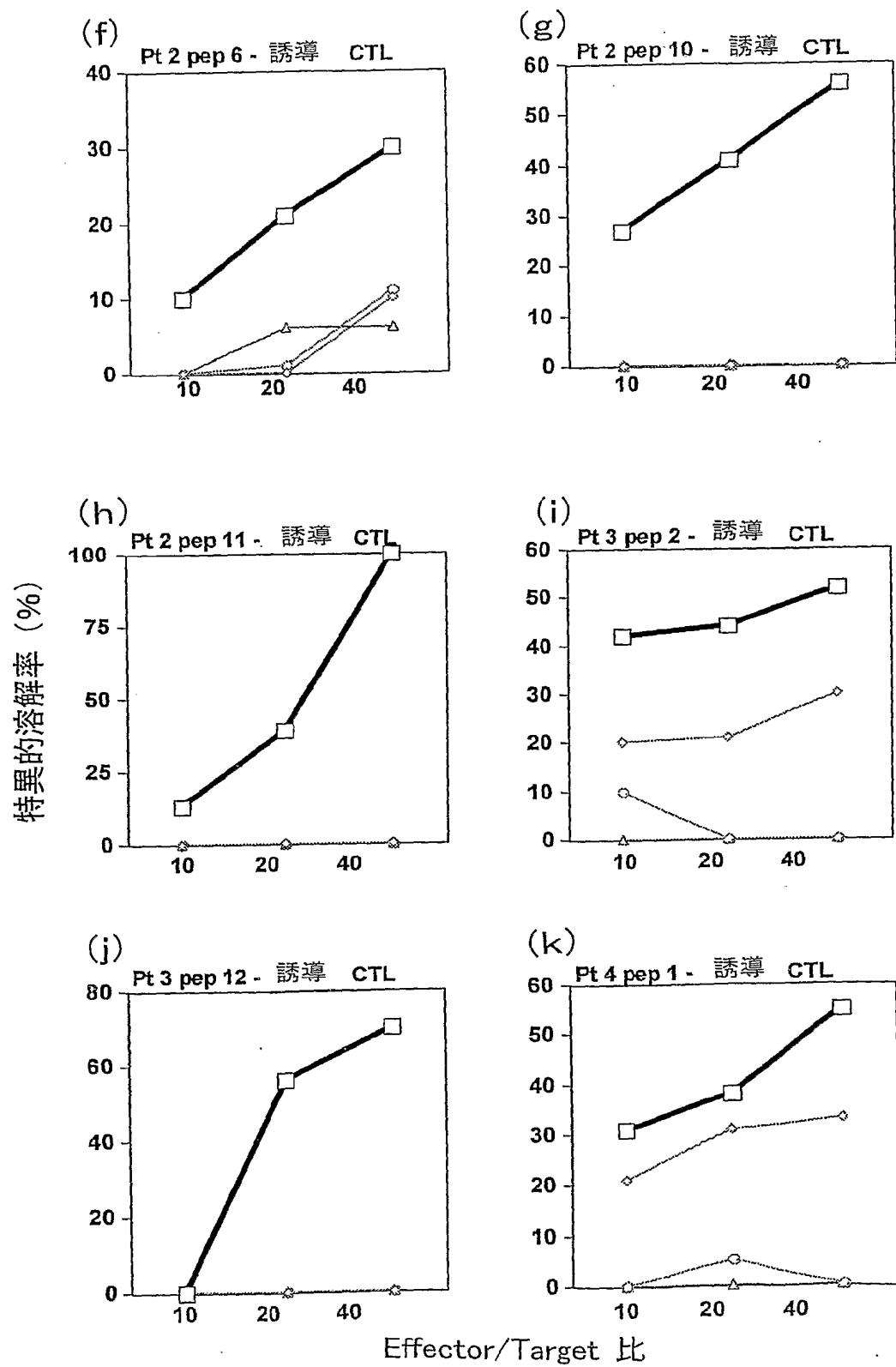


図3

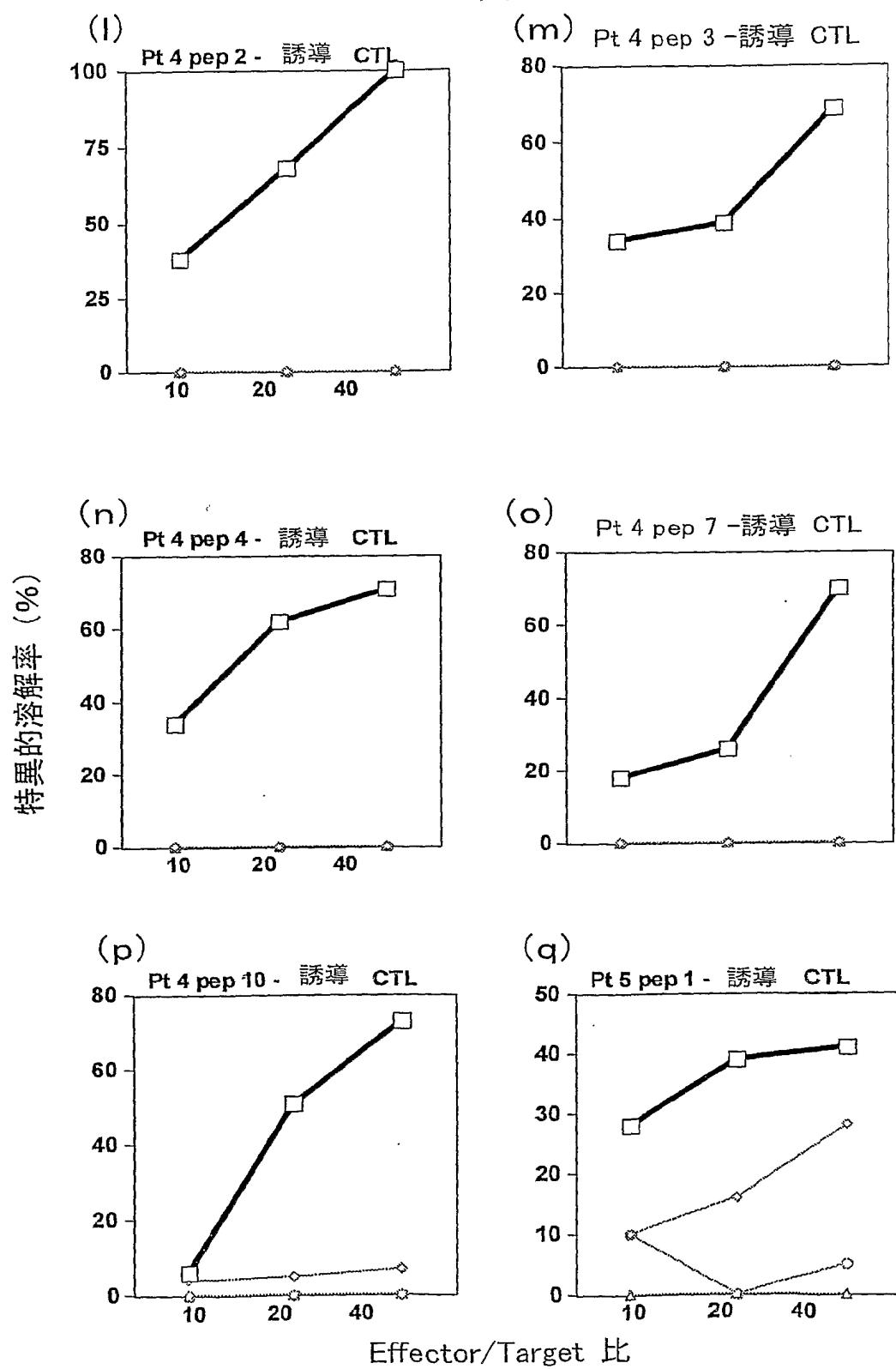


図3

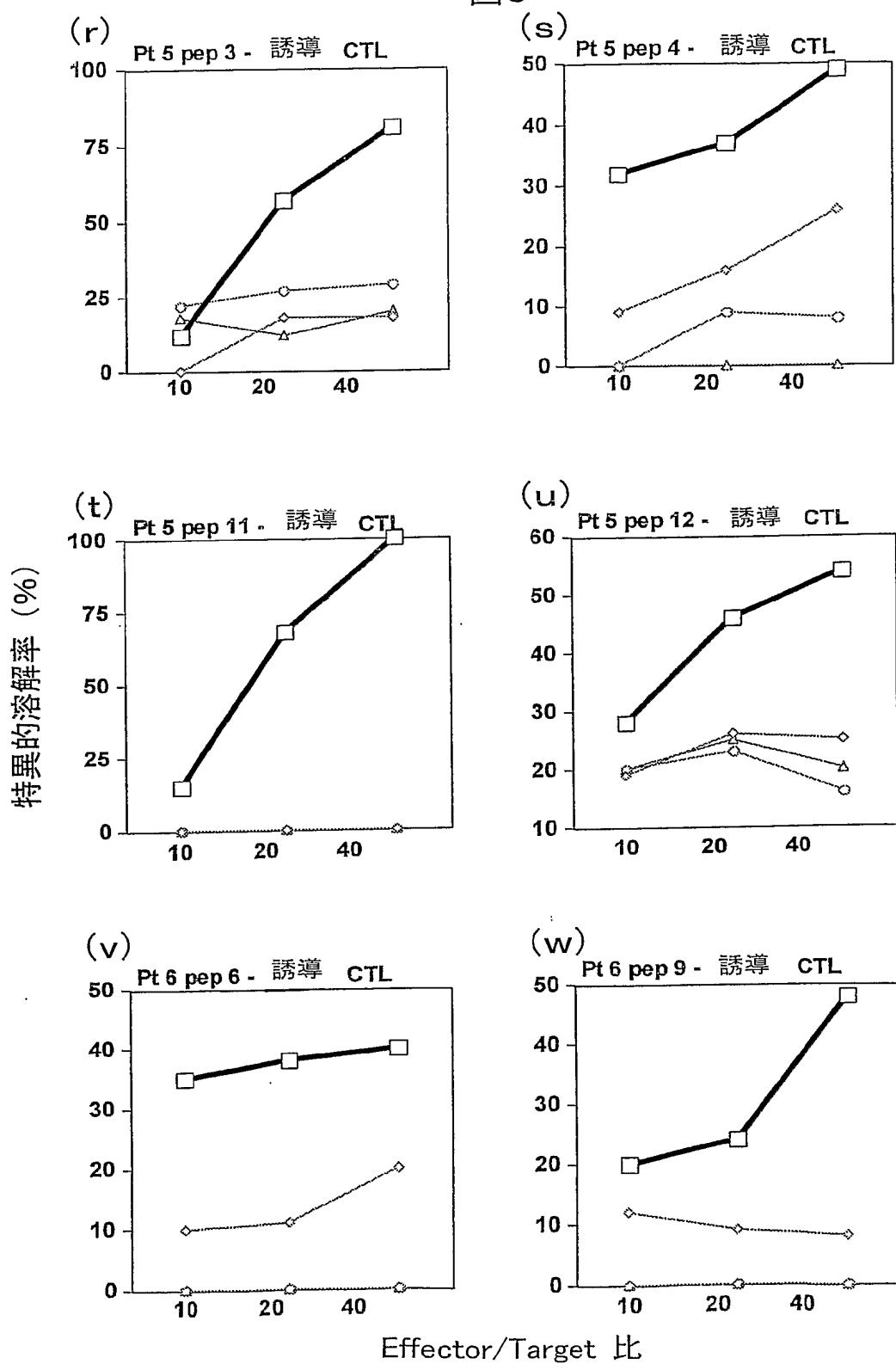


図3

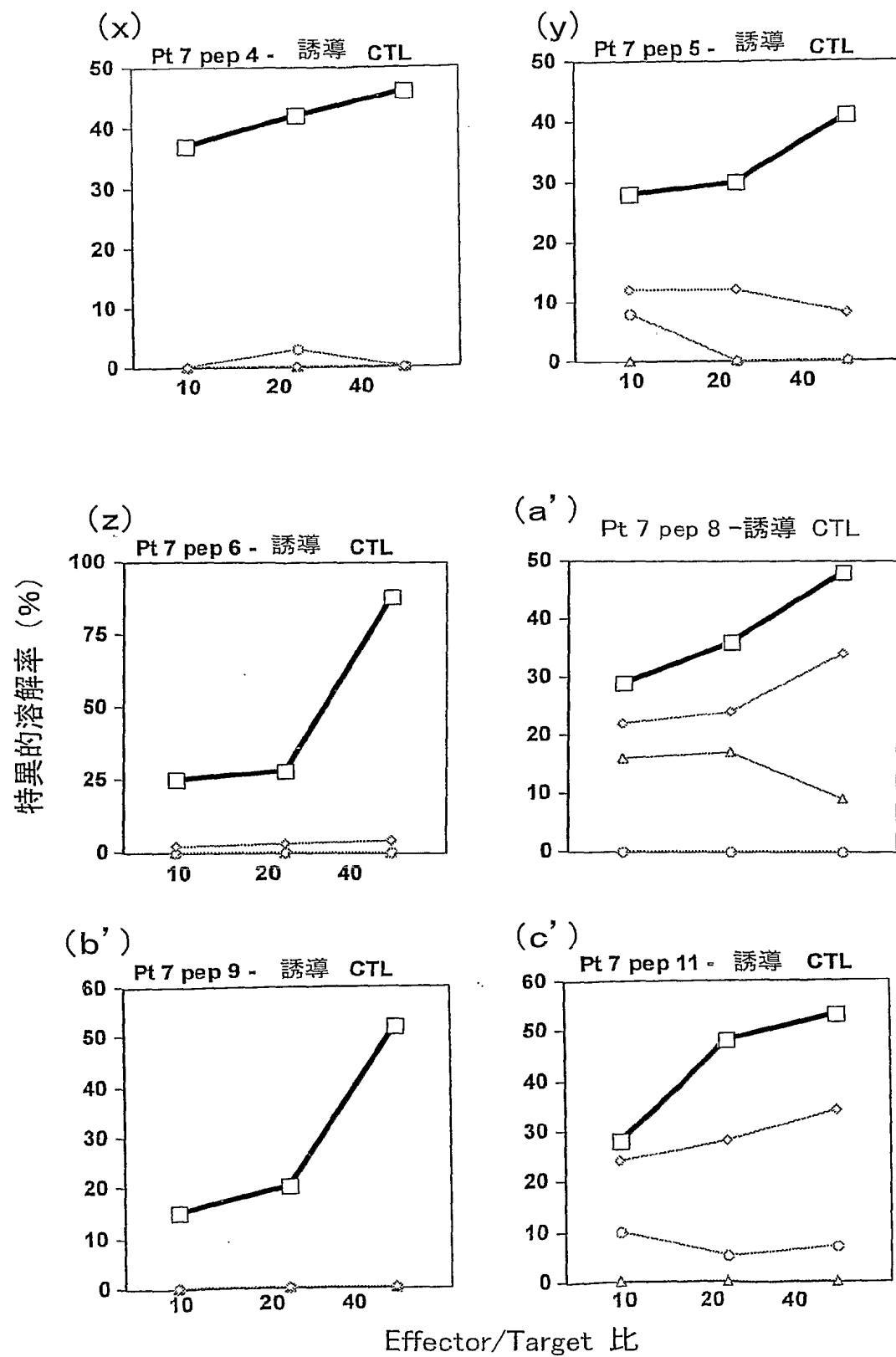
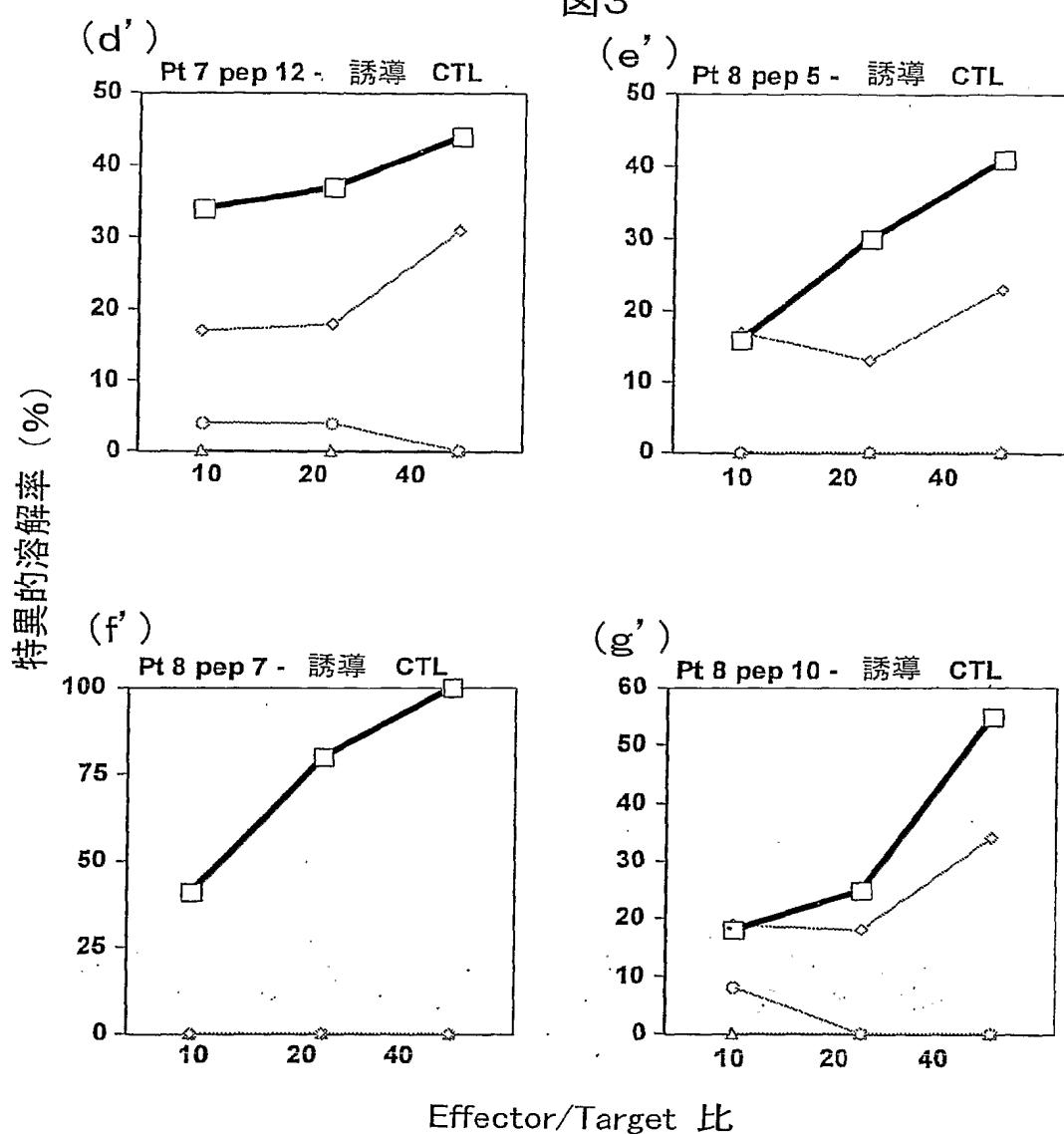


図3



## 図4

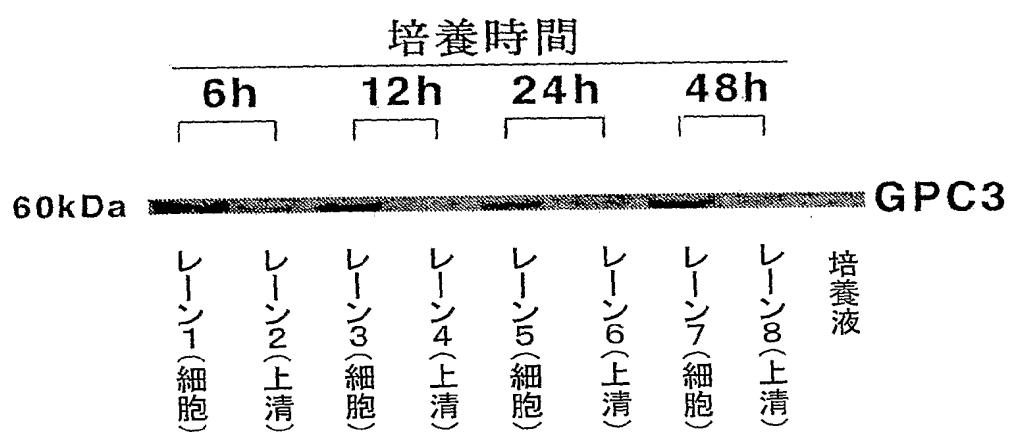


図5

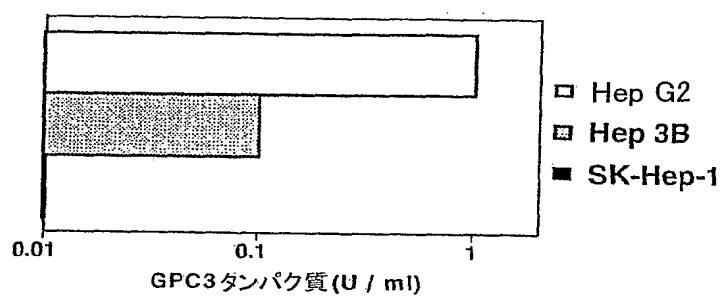


図 6

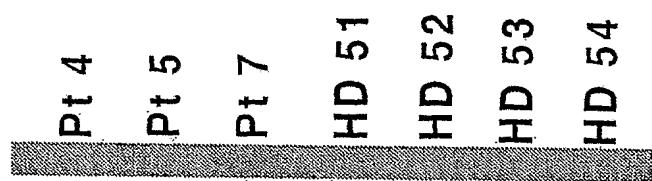
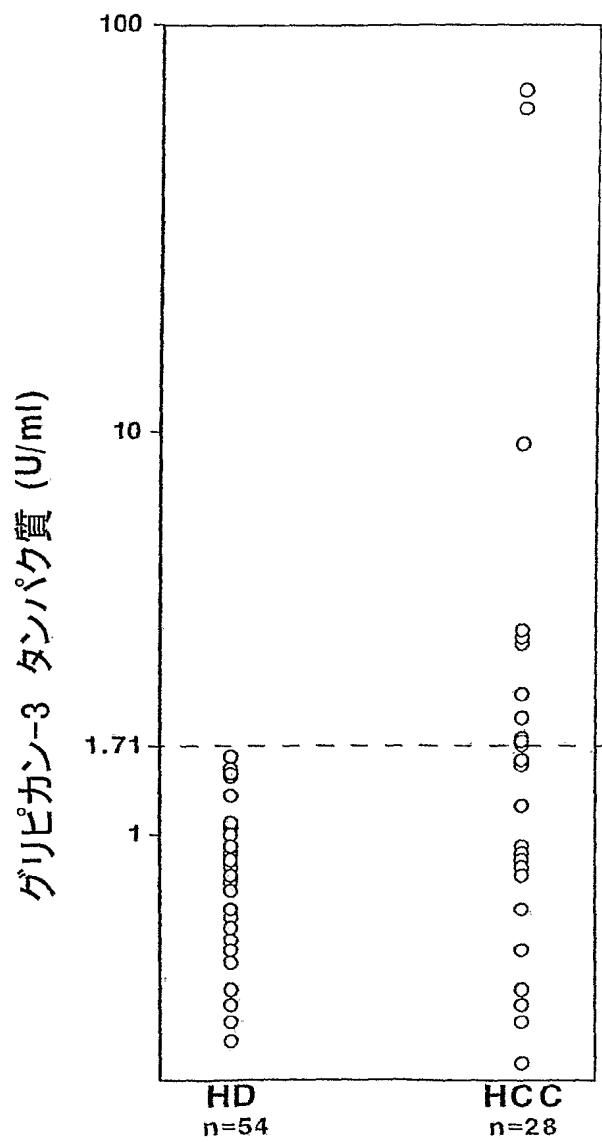


図7



## SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> A peptide and a medicament comprising the peptide

<130> PH-1870-PCT

<150> JP 2002-245831

<151> 2002-08-26

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gttactgc aa tgtggtc atg c

21

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ctggtgccca gcacatgt 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cctcgccctt gccgatcc 18

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ggatcttcat gaggtagtca gtc 23

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu

1

5

10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu

1

5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu

1

5

10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu

1

5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu

1

5

10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu Leu

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile

1

5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile

1

5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu

1

5

10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10459

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/82, C07K5/06, A61K39/00, A61P35/00,  
G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/82, C07K5/06, A61K39/00, A61P35/00,  
G01N33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Zhu ZW et al., Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders, Gut, 2001, Vol.48(4), pages 558 to 564	1-15,18
Y	Pilia G. et al., Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, Nat.Genet., 1996, Vol.12(3), pages 241 to 247	1-15,18
Y	NUKAYA, I. et al., Identification of HLA-A24 epitope peptides of carcinoembryonic antigen which induce tumor-reactive cytotoxic T lymphocyte, Int. J.Cancer, 1999, Vol.80(1), pages 92 to 97	1-15,18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 October, 2003 (22.10.03)

Date of mailing of the international search report  
11 November, 2003 (11.11.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/10459

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	NAKATSURA, T. et al., Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker, Biochem.Biophys.Res. Commun., 2003 June, Vol.306(1), pages 16 to 25	1-15,18
A	OKABE, H. et al., Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression, Cancer Res., 2001, Vol.61(5), pages 2129 to 2137	1-15,18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/10459

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 16, 17  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as set forth in claims 16, 17 pertain to methods for diagnosis of the human body .
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**     The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
                             No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N15/09, C07K14/82, C07K5/06, A61K39/00, A61P35/00, G01N33/574

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N15/09, C07K14/82, C07K5/06, A61K39/00, A61P35/00, G01N33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Zhu ZW et al, Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders, Gut, 2001, vol. 48(4), p. 558-564	1-15, 18
Y	Pilia G et al, Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, Nat Genet, 1996, vol. 12(3), p. 241-247	1-15, 18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 10. 03

国際調査報告の発送日

11.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

光本 美奈子

4 B 9359



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nukaya I et al, Identification of HLA-A24 epitope peptides of carcinoembryonic antigen which induce tumor-reactive cyto toxic T lymphocyte, Int J Cancer, 1999, vol. 80(1), p. 92-97	1-15, 18
PX	Nakatsura T et al, Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker, Biochem Biophys Res Commun, 2003 Jun, vol. 306(1), p. 16-25	1-15, 18
A	Okabe H et al, Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression, Cancer Res, 2001, vol. 61(5), p. 2129-2137	1-15, 18

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 16, 17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の診断方法に係る発明である。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。